

(11)Publication number : 2000-178304

(43)Date of publication of application : 27.06.2000

(51)Int.Cl.

C08B 37/08

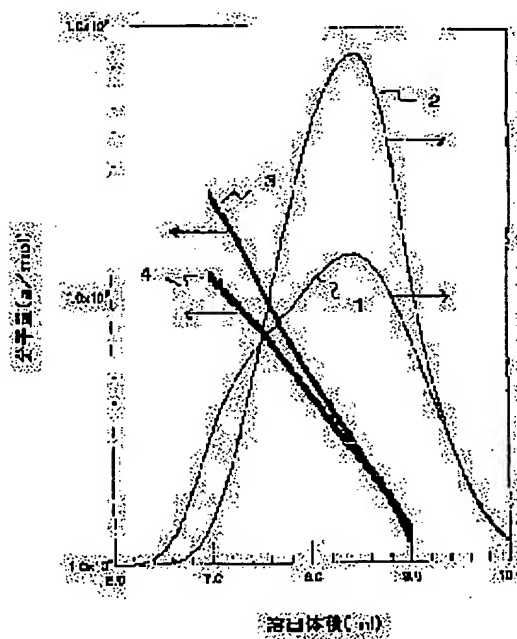
(21)Application number : 10-355527

(71)Applicant : DENKI KAGAKU KOGYO  
KK

(22)Date of filing : 15.12.1998

(72)Inventor : OSHIMA KAZUHIRO  
OKAMOTO AKIO  
MIYATA YOSHIAKI  
KAWADA MASATOSHI

(54) PRODUCTION OF HYALURONIC ACID GEL



(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a hyaluronic acid gel which can be used as a biocompatible material with a long residence time in the living body, without using any chemical crosslinker or chemical modifier and without forming a composite with a cationic polymer for the best use of the feature, i.e., the excellent biocompatibility inherent in hyaluronic acid.

SOLUTION: The process for producing a hyaluronic acid gel hardly soluble in a neutral aqueous solution comprises freezing an acidic hyaluronic acid solution made by using a mixture of a polar organic solvent and water as

the solvent and having a pH of 3.5 or lower, and then thawing the solution. The hyaluronic acid gel is formed from an acidic hyaluronic acid solution of which the concentration of hyaluronic acid is at least 5 wt.%, in which the solvent used comprises a mixture of a polar organic solvent and water, and which contains an acid component in an amount at least equimolar to that of the carboxy groups of hyaluronic acid.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-178304  
(P2000-178304A)

(43) 公開日 平成12年6月27日 (2000.6.27)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

C 0 8 B 37/08

識別記号

F I

C 0 8 B 37/08

テームコード (参考)

Z 4 C 0 9 0

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号

特願平10-355527

(22) 出願日

平成10年12月15日 (1998.12.15)

(71) 出願人

000003296

電気化学工業株式会社

東京都千代田区有楽町 1 丁目 4 番 1 号

(72) 発明者

大島 和宏

東京都町田市旭町 3 丁目 5 番 1 号 電気化学工業株式会社総合研究所内

(72) 発明者

岡本 彰夫

東京都町田市旭町 3 丁目 5 番 1 号 電気化学工業株式会社総合研究所内

(72) 発明者

宮田 喜明

東京都町田市旭町 3 丁目 5 番 1 号 電気化学工業株式会社総合研究所内

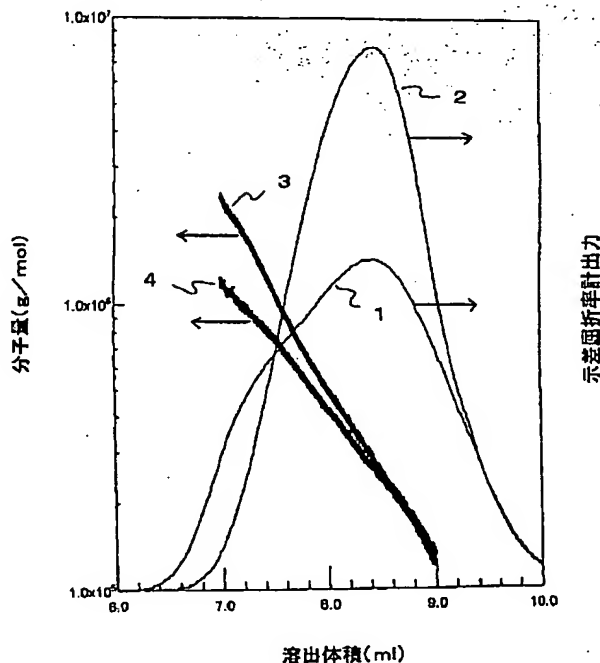
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸ゲルの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 ヒアルロン酸自体が本来持っている優れた生体適合性の特徴を最大限生かすために、なんら化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することなく、またカチオン性の高分子と複合体化することなく、生体適合材料として使用可能な、生体内滞留時間が長いヒアルロン酸ゲルを提供すること。

【解決手段】 溶媒として極性有機溶媒と水との混合溶媒を用いて、かつ、pH 3.5 以下に調整されたヒアルロン酸酸性溶液を凍結し、次いで解凍して形成されることを特徴とする中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸ゲルの製造方法を構成とする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 溶媒として極性有機溶媒と水との混合溶媒を用いて、かつ、pH3.5以下に調整されたヒアルロン酸酸性溶液を凍結し、次いで解凍して形成されることを特徴とする中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸ゲルの製造方法。

【請求項2】 ヒアルロン酸をヒアルロン酸濃度5重量%以上で、溶媒として極性有機溶媒と水との混合溶媒を用いて、かつ、ヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分を含むヒアルロン酸酸性溶液から形成することを特徴とする中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸ゲルの製造方法。

【請求項3】 ヒアルロン酸をヒアルロン酸濃度5重量%以上で、溶媒として極性有機溶媒と水との混合溶媒を用いて、かつ、ヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分を含むヒアルロン酸酸性溶液を中和処理前に-10℃～30℃で熟成することにより形成することを特徴とする中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸ゲルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なヒアルロン酸ゲルの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒアルロン酸は、 $\beta$ -D-N-アセチルグルコサミンと $\beta$ -D-グルクロン酸が交互に結合した直鎖状の高分子多糖である。ヒアルロン酸は哺乳動物の結合組織に分布するほか、ニワトリのとさか、連鎖球菌の夾膜などにも存在が知られている。ニワトリのとさか、臍帯等が抽出材料として用いられているほか、連鎖球菌の培養物からも精製物が調整されている。

【0003】天然産のヒアルロン酸は、分子量について多分散性であるが、種及び臓器特異性をもたず、生体に移植または注入した場合であっても優れた生体適合性示すことが知られている。さらに、生体に適用する場合のヒアルロン酸自体の易水溶性に由来する短所、例えば、生体内滞留時間が比較的に短いことなどから、多種多様なヒアルロン酸の化学修飾物も提案されている。

【0004】これらの代表的なものとしては、ジビニルスルホン、ビスエポキシド類、ホルムアルデヒド等の二官能性試薬を架橋剤に使用して、得られた高膨潤性の架橋ヒアルロン酸ゲルを挙げることができる(米国特許第4,582,865号明細書、特公平6-37575号公報、特開平7-97401号公報、特開昭60-130601号公報参照)。

【0005】また、共有結合を形成する化学的試薬を使用することなく、ヒアルロン酸を水に不溶化する方法として、ヒアルロン酸とアミノ基あるいはイミノ基を有する高分子化合物とを、ヒアルロン酸のカルボキシル基と高分子化合物のアミノ基あるいはイミノ基をイオン複合体として結合させてヒアルロン酸高分子複合体を調整す

る方法が開示されている(特開平6-73103号公報参照)。

【0006】ヒアルロン酸水溶液を酸性、例えばpH2.0～2.7の範囲に調整するとパティーゲルと呼ばれるゼリー状に固化した状態のゲルを形成することは知られているが、pH2.0未満では、パティーゲルは形成されない。そして、このパティーゲルは、中性水溶液中に投入すると速やかに溶解するので、本発明でいうヒアルロン酸ゲルとは異なる。

【0007】また、ヒアルロン酸水溶液を、pH2.0～3.8、20～80重量%水溶性有機溶剤存在下におくことを特徴とするヒアルロン酸ゲルの製造方法も開示されている(特開平5-58881号公報参照)。しかしながら、この製造方法で得られたヒアルロン酸ゲルは、コーティング等を施さない場合には、水中に投入すると溶解することが該公報に記載されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】ヒアルロン酸自体が本来持っている優れた生体適合性の特徴を最大限生かすために、なんら化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することなく、またカチオン性の高分子と複合体化することなく、生体適合性材料として使用可能な、生体内滞留時間が長いヒアルロン酸ゲルは未だ開発されていない。本発明者らは、上記目的を達成するために、ヒアルロン酸自体の物理化学的性質を鋭意検討してきた。その結果、溶媒として極性有機溶媒と水との混合溶媒を用いて、かつ、ヒアルロン酸を特定のpHに調整したヒアルロン酸酸性溶液を凍結し、次いで解凍することによって、ヒアルロン酸ゲルが得られることを見出した。また、ヒアルロン酸をヒアルロン酸濃度5重量%以上で、溶媒として極性有機溶媒と水との混合溶媒を用いたヒアルロン酸酸性溶液から上記ヒアルロン酸ゲルが形成されることを見出した。

【0009】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、(1)溶媒として極性有機溶媒と水との混合溶媒を用いて、かつ、pH3.5以下に調整されたヒアルロン酸酸性溶液を凍結し、次いで解凍して形成されることを特徴とする中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸ゲルの製造方法、(2)ヒアルロン酸をヒアルロン酸濃度5重量%以上で、溶媒として極性有機溶媒と水との混合溶媒を用いて、かつ、ヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分を含むヒアルロン酸酸性溶液から形成することを特徴とする中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸ゲルの製造方法、(3)ヒアルロン酸をヒアルロン酸濃度5重量%以上で、溶媒として極性有機溶媒と水との混合溶媒を用いて、かつ、ヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分を含むヒアルロン酸酸性溶液を中和処理前に-10℃～30℃で熟成することにより形成することを特徴とする中性水溶液に難溶性であるヒアルロ

ン酸ゲルの製造方法である。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に用いられるヒアルロン酸は、動物組織から抽出したものでも、また発酵法で製造したものでもその起源を問うことなく使用できる。発酵法で使用する菌株は自然界から分離されるストレプトコッカス属等のヒアルロン酸生産能を有する微生物、又は特開昭63-123392号公報に記載したストレプトコッカス・エクイFM-100（微工研菌寄第9027号）、特開平2-234689号公報に記載したストレプトコッカス・エクイFM-300（微工研菌寄第2319号）のような高収率で安定にヒアルロン酸を生産する変異株が望ましい。上記の変異株を用いて培養、精製されたものが用いられる。

【0011】ゲルとは、新版高分子辞典（朝倉書店 昭和63年）によれば、「あらゆる溶媒に不溶の三次元網目構造をもつ高分子及びその膨潤体」と定義されている。理化学辞典（岩波書店 第4版 昭和62年）によれば、「ゾル（コロイド溶液）がゼリー状に固化したもの」と定義されている。本発明で言うヒアルロン酸ゲルとは、中性水溶液に難溶性であることを特徴とし、このヒアルロン酸ゲルを中性水溶液中に投入すると、ゲル化していないヒアルロン酸と比較して有意に難溶性を示す。難溶性は、中性の25℃の水溶液中でのゲルの溶解率で規定する。ここで、中性水溶液とは、pH7に調整された緩衝能を有する生理的食塩水である。

【0012】本発明でいうヒアルロン酸ゲルとは、三次元網目構造をもつ高分子及びその膨潤体である。三次元網目構造はヒアルロン酸の架橋構造によって形成されている。

【0013】本発明でいうヒアルロン酸ゲルは、ヒアルロン酸の促進酸加水分解反応条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで分解、可溶化することができる。可溶化されたヒアルロン酸が架橋構造を保持している場合、分岐点を有するヒアルロン酸として高分子溶液論的に直鎖状のヒアルロン酸と区別することができる。ヒアルロン酸自体は直鎖状の高分子であり、分岐構造を有さないことが知られている（多糖生化学1 化学編 共立出版 昭和44年）。

【0014】本発明でいうヒアルロン酸ゲル中に、ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でも安定に存在する架橋構造がある場合、可溶化されたヒアルロン酸に分岐構造が高分子溶液論的に確認される。

【0015】可溶化されたヒアルロン酸の分子量と分岐度を測定する方法には、ゲルパーミエーションクロマトグラム（GPC）に検出器として示差屈折率計と多角度レーザー光散乱検出器（MALLS）を使うGPC-MALLS法がある。

【0016】本発明で得られるヒアルロン酸ゲルは、ヒアルロン酸単独で形成される。ここでいうヒアルロン酸

単独とは、ヒアルロン酸以外に化学的架橋剤や化学的修飾剤等を使用しないこと、また、カチオン性の高分子と複合体化しないことを意味するものである。

【0017】ヒアルロン酸の化学的架橋剤は、ヒアルロン酸のカルボキシル基、水酸基、アセトアミド基と反応して共有結合を形成する多価化合物であり、ポリグリシジルエーテル等の多価エポキシ化合物、ジビニルスルホン、ホルムアルデヒド、オキシ塩化リン、カルボジイミド化合物とアミノ酸エステルの併用、カルボジイミド化合物とジヒドラジド化合物の併用を例として挙げることができる。ヒアルロン酸と化学的架橋剤との反応により三次元網目構造が形成される。

【0018】ヒアルロン酸の化学的修飾剤は、ヒアルロン酸のカルボキシル基、水酸基、アセトアミド基と反応して共有結合を形成する化合物であり、無水酢酸と濃硫酸の併用、無水トリフルオロ酢酸と有機酸の併用、ヨウ化アルキル化合物を例として挙げることができる。ヒアルロン酸の親水性基を疎水化し、ヒアルロン酸の水溶性が減少する。

【0019】ヒアルロン酸と複合体化するカチオン性の高分子は、ヒアルロン酸のカルボキシル基と高分子化合物のアミノ基あるいはイミノ基の間でイオン複合体を形成する高分子であり、キトサン、ポリリジン、ポリビニルピリジン、ポリエチレンイミン、ポリジメチルアミノエチルメタクリレートなどを例として挙げることができる。ヒアルロン酸とカチオン性の高分子は複合体化することにより、水に不溶化する。

【0020】一方、ヒアルロン酸への架橋構造の導入やヒアルロン酸の不溶化、難溶化に直接関係しない物質を、本発明でいうヒアルロン酸ゲルを形成させる際に添加することはできる。ヒアルロン酸と同様に生体適合性に優れた材料、例えば、コンドロイチン硫酸、カルボキシメチルセルロース等を混合、複合化してヒアルロン酸ゲルを形成させることができるものであり、何ら制限されないものである。また、ヒアルロン酸ゲルを形成させる際に、薬学的又は生理学的に活性な物質を添加して、これらを含むヒアルロン酸ゲルを形成させることもできるものであり、何ら制限されないものである。

【0021】本発明に用いられるヒアルロン酸の分子量は、約 $1 \times 10^5$ ～約 $1 \times 10^7$ ダルトンの範囲内のものであれば、いずれも使用することができる。また、上記範囲内の分子量をもつものであれば、より高分子量のものから、加水分解処理等を介して得られた低分子量のものも同様に使用できる。なお、本発明にいうヒアルロン酸は、そのアルカリ金属、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する概念で使用される。

【0022】本発明で用いられるヒアルロン酸酸性溶液とは、溶媒として極性有機溶媒と水との混合溶媒を用い、かつ、酸性に調整された溶液を意味している。

【0023】本発明で用いる極性有機溶媒とは、水と完

全に相溶し、かつ、その極性有機溶媒と水との混合溶媒がヒアルロン酸を室温又は室温以上の温度で溶解し、溶液を形成することができる極性を有する水溶性有機化合物を意味する。

【0024】本発明では、極性有機溶媒として、メタノール、エタノール、プロパノール等の低級アルコール系溶媒；グリセリンやエチレングリコール等の多価アルコール系溶媒；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン系溶媒；ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメトキシエタン等のエーテル系溶媒；ホルムアミド、N、N-ジメチルホルムアミド、アセトアミド、N、N-ジメチルアセトアミド、2-ピロリドン、N-メチル-2-ピロリドン等のアミド系溶媒；ジメチルスルホキシド、テトラヒドロチオフェン-1、1-ジオキシド等のスルホキシド系溶媒；ヘキサメチルホスホリクトリアミド等のリン酸アミド系溶媒；アセトニトリル等を使用することができる。該極性有機溶媒は、1種類のみを使用してもまたは2種類以上を併用してもよい。

【0025】本発明で用いられるヒアルロン酸の溶液の調製にあたっては、極性有機溶媒と水との混合溶媒中にヒアルロン酸の粉末を直接溶解させてもよいが、一旦、ヒアルロン酸を水に溶解させ、該水溶液に極性有機溶媒を適量添加しても構わない。

【0026】本発明で用いる混合溶媒中における極性有機溶媒の濃度は、50重量%以上になるとヒアルロン酸の粉末が溶解し難く、また、ヒアルロン酸水溶液に対して50重量%以上の極性有機溶媒を添加するとヒアルロン酸が析出して所望の溶液が調製し難くなるため、0重量%より大きく50重量%以下にするのが望ましい。

【0027】本発明でヒアルロン酸溶液のpHを調整するために使用する酸は、ヒアルロン酸より強い酸であれば、いずれの酸も使用することができる。酸の使用量を低減するために、好ましくは強酸、例えば、塩酸、硝酸、硫酸等を使用することが望ましい。そして、ヒアルロン酸溶液のpH、または、酸成分の量は、ヒアルロン酸のカルボキシル基が充分な割合でプロトン化するように調製する。

【0028】上記のようなヒアルロン酸酸性溶液の調整に当たっては、ヒアルロン酸を極性有機溶媒と水との混合溶媒に溶解した溶液に酸成分をくわえても、またはヒアルロン酸水溶液で酸性に調製した後に極性有機溶媒を加えてもよい。また、あらかじめ極性有機溶媒と水との混合溶媒を酸性に調製した後にヒアルロン酸を完全に溶解させるようにしてもよい。

【0029】本発明では、pH3.5以下に調整されたヒアルロン酸酸性溶液を凍結し、次いで解凍すると、中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸ゲルが得られる。

【0030】凍結、解凍はヒアルロン酸酸性溶液を、任意の容器に入れた後、所定の温度で凍結させ、凍結が終了した後、所定の温度で解凍させる操作を少なくとも1

回行う。凍結、解凍の温度と時間は、容器の大きさ、水溶液量によりヒアルロン酸の酸性溶液が凍結、解凍する温度と時間の範囲内で適宜決められるが、一般には、氷点以下の凍結温度、氷点以上の解凍温度が好ましい。凍結、解凍時間を短くできることから、更に好ましくは-5℃以下の凍結温度、5℃以上の解凍温度が選ばれる。また、時間は、その温度で凍結、解凍が終了する時間以上であれば特に制限されない。

【0031】凍結、解凍する場合、使用する極性有機溶媒と水との混合溶媒の混合比としては、用いる凍結温度で該ヒアルロン酸酸性溶液が凍結する混合比が望ましい。極性有機溶媒の割合が多いとヒアルロン酸酸性溶液の氷点が下がり、該溶液が凍結し難くなる。

【0032】ヒアルロン酸酸性溶液を凍結し、次いで解凍する操作の繰り返し回数は、使用するヒアルロン酸の分子量、ヒアルロン酸濃度、溶液のpH、凍結及び解凍の温度と時間、並びに生成するゲルの強さ等の諸特性により適宜決められる。通常は1回以上繰り返すことが好ましい。また、凍結、解凍の操作を繰り返すごとに、その凍結、解凍の温度及び時間を変えても構わない。

【0033】また、本発明では、ヒアルロン酸濃度5重量%以上のヒアルロン酸酸性溶液を、ゲル化を進行させるために、生成するゲルの中和処理の前に熟成することによってヒアルロン酸ゲルを形成することができる。この熟成させる温度や時間は、ヒアルロン酸酸性溶液のヒアルロン酸塩の対イオンの種類、ヒアルロン酸の分子量、ヒアルロン酸濃度、並びに生成するゲルの強さ等の諸特性により適宜決められるが、温度については、熟成中でのヒアルロン酸の酸による分解を抑えるために、好ましくは30℃以下で行うことが望ましい。

【0034】本発明に用いられるヒアルロン酸濃度5重量%以上のヒアルロン酸酸性溶液の調製方法は問わないが、固体ヒアルロン酸と極性有機溶媒と水との混合溶媒である酸性溶液を混合する方法、低濃度で調製したヒアルロン酸酸性溶液を所定の濃度に濃縮する方法や、高濃度のヒアルロン酸溶液に酸成分を加える方法などが挙げられる。

【0035】固体ヒアルロン酸と酸性水溶液を混合する方法の場合、混合する固体ヒアルロン酸の形態は問わないが、粉末、ヒアルロン酸粉末を加圧成型して得られるブロック状の成型物、ヒアルロン酸を蒸留水に溶解して水溶液にした後、通風乾燥して得られるキャストフィルムや凍結乾燥後に得られるスポンジ状ヒアルロン酸などの形態が考えられる。混合方法としては、固体ヒアルロン酸に極性有機溶媒と水との混合溶媒に酸成分を加えた溶液を所定の濃度になるように含浸させる方法や、固体ヒアルロン酸に上記酸性溶液を添加し混練する方法などがある。

【0036】低濃度で調製したヒアルロン酸酸性溶液を所定の濃度に濃縮する方法の場合、まず、固体ヒアルロ

ン酸を極性有機溶媒と水との混合溶媒に溶解した後に酸成分を加える事や固体ヒアルロン酸を直接酸性の極性有機溶媒と水との混合溶媒に溶解する事などによって、低濃度のヒアルロン酸酸性溶液を調製する。ここで、溶解する固体ヒアルロン酸の形態は問わない。また、ここでいう低濃度とは、目的のヒアルロン酸ゲルのヒアルロン酸濃度より低いことをいうが、扱い易いと言う点で好ましくはヒアルロン酸濃度が5重量%以下が望ましい。濃縮方法としては、超遠心分離、通風乾燥、減圧乾燥、凍結乾燥などが挙げられる。

【0037】高濃度のヒアルロン酸溶液に酸成分を加える方法の場合、まず、固体ヒアルロン酸と極性有機溶媒と水との混合溶媒を混合する事や、低濃度のヒアルロン酸溶液を濃縮することなどにより、高濃度のヒアルロン酸溶液を調製する。この時に用いる固体ヒアルロン酸の形態は問わない。得られた高濃度のヒアルロン酸溶液に酸成分を添加する方法としては、気体状態の酸、例えば塩化水素の雰囲気下に曝す方法などが挙げられる。

【0038】本発明で得られたヒアルロン酸ゲルは、ヒアルロン酸の加水分解を避けるために、カルボキシ基がプロトン化された酸型のヒアルロン酸や酸性に調整するために用いた酸等の成分を中和する必要がある。中和は、通常水性溶媒によって行う。ヒアルロン酸ゲルの機能を損なわないものであれば特に制限はないが、例えば、リン酸緩衝液、水酸化ナトリウム水溶液等が用いられる。

【0039】また、中和方法は、特に制限はないが、通常は、バッチ法、汙過法、カラム等に充填して通液する方法等が用いられる。これらの中和条件は、中和液量、回数等を含めて、酸型のヒアルロン酸や酸性に調整するために用いた酸等の成分を中和できる条件であればよく、ヒアルロン酸ゲルの形態や用途により適宜選択することが可能である。

【0040】この中和されたヒアルロン酸ゲルは、その使用目的に応じて、溶媒中に浸漬した状態、溶媒を含ませた湿潤状態、通風乾燥、減圧乾燥あるいは凍結乾燥等の処理を経た乾燥状態で供される。

【0041】ヒアルロン酸ゲルの成形加工等の処理は、作製時には、ヒアルロン酸及び調製されたヒアルロン酸酸性水溶液の容器や手法の選択によりシート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、及びチューブ状の所望の形態のヒアルロン酸ゲルの作製が可能である。例えば、ヒアルロン酸粉末を加圧成型したものより、ブロック状及びシート状の形態が得られる。ヒアルロン酸ゲルの作製後の加工としては、機械的粉碎による微細な破碎状や凍結、解凍によるスポンジ状、圧延によるフィルム化、紡糸等が例示される。

【0042】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳しく説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

い。

#### 【0043】実施例1

分子量が $2 \times 10^6$  ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムをジメチルスホキシドが1重量%である混合溶媒に溶解し、1重量%のヒアルロン酸溶液を調製した。この水溶液のpHを、1N塩酸でpH1.5に調整した。さらにこのヒアルロン酸酸性溶液15mlを30mlのガラスビンに入れ、 $-20^\circ\text{C}$ に設定した冷凍庫に入れた。14時間放置した後、 $25^\circ\text{C}$ で解凍した。その結果、きめの細かいスポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。

#### 【0044】実施例2

実施例1に於いて、ヒアルロン酸濃度を0.1重量%にしてヒアルロン酸溶液を調製した。そして、実施例1と同様の操作を行った。その結果、きめの細かいスポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。

#### 【0045】実施例3

実施例1に於いて、エタノールが5重量%である混合溶媒に溶解したヒアルロン酸溶液を調製した。そして、実施例1と同様の操作を行った。12時間以上の凍結と $25^\circ\text{C}$ で2時間以上の解凍を6回繰り返した。その結果、きめの細かいスポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。

#### 【0046】実施例4

分子量が $2 \times 10^6$  ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムの粉末100mgを $300\text{kgf/cm}^2$ で3分間加圧し、 $8\text{mm} \times 8\text{mm} \times 2\text{mm}$ の直方体の成型物を得た。この成型物を、スチロール製の角型容器に入れ、1Nの塩酸を含むジメチルスホキシドが10重量%である混合溶媒を570mg、ヒアルロン酸濃度にして15重量%になるように含浸させ容器を密閉した後、 $5^\circ\text{C}$ に設定した冷蔵庫に6日間静置保存した。その結果、直方体の透明なヒアルロン酸ゲルが得られた。

#### 【0047】実施例5

実施例1に於いて、ヒアルロン酸濃度が7重量%になるように1Nの塩酸を含むジメチルスホキシドが10重量%である混合溶媒を1330mg含浸させた。そして、実施例4と同様の操作を行った。その結果、直方体の透明なヒアルロン酸ゲルが得られた。

#### 【0048】比較例1

実施例1に於いて、ヒアルロン酸の溶液のpHを調整せずに、凍結し、解凍することを8回繰り返した。その結果、ヒアルロン酸の水溶液の変化は起こらなかった。すなわち、ゲル化しなかった。

#### 【0049】比較例2

実施例1で調整したヒアルロン酸溶液を使って、ガラス板上で $80^\circ\text{C}$ で風乾し、厚さ約 $100\mu$ のキャストフィルムを得た。該キャストフィルムをヒアルロン酸ゲルの溶解性試験に用いた。

#### 【0050】比較例3

実施例1で調整したヒアルロン酸の溶液を $-20^\circ\text{C}$ で凍

結し、凍結乾燥してスポンジ状のヒアルロン酸を得た。該スポンジ状のヒアルロン酸をヒアルロン酸ゲルの溶解性試験に用いた。

#### 【0051】比較例4

実施例4に於いて、1Nの塩酸を含まないジメチルスホキシドが10重量%である混合溶媒を用いて同様の操作を行った。その結果、透明なヒアルロン酸ゲル状の溶液が得られた。

#### 【0052】実施例6

##### ヒアルロン酸ゲルの溶解性試験

生理的食塩水に50mM濃度でリン酸緩衝成分を加え、pH7のリン酸緩衝生理的食塩水を調製した。得られたヒアルロン酸ゲルを、乾燥重量で10mgのヒアルロン酸を含むヒアルロン酸ゲルに対して、50mlのリン酸緩衝生理的食塩水の割合で、リン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。また、比較例2、3のヒアルロン酸固形物や比較例4のヒアルロン酸ゲル状溶液も、乾燥重量で10mgを50mlのリン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。そして、25℃で攪拌下のリン酸緩衝生理的食塩水中に溶出するヒアルロン酸の割合を、リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸濃度から求めた。従って、中性の25℃の水溶液中でのヒアルロン酸ゲルの溶解性は、上記試験により規定されるものである。

#### 【0053】ヒアルロン酸濃度の測定

リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸の濃度は、GPCを使って、示差屈折率検出器のピーク面積から求めた。

【0054】上記に従い、具体的に実施例1～5及び比較例2～4のヒアルロン酸ゲルの溶解性試験を行った。その結果を表1に示す。例えば、実験No. 1の実施例1で得られたヒアルロン酸ゲルの溶解率を調べると、1日経過後では1%の溶解率であり、3日経過後では3%の溶解率であり、7日経過後では4%の溶解率であり、更に14日経過後では12%の溶解率であった。即ち、7日経過しても95%以上のヒアルロン酸ゲルが残存していた。それに対して、実験No. 6の比較例2で得られた約100 $\mu$ mキャストの溶解率は、1日経過後で100%の溶解率であり、完全に溶解した。よって、比較例(実験No. 6～8)で得られたヒアルロン酸固形分やヒアルロン酸ゲル状の溶液は水中での溶解速度が極めて速いのに対して、本願発明の製造方法で得られたヒアルロン酸ゲル(例えば、実験No. 1～5)の水中での溶解速度が極めて遅いことが見出される。これより、本願発明で得られたヒアルロン酸ゲルは、生体内滞留時間が長いことが示唆される。

#### 【0055】

##### 【表1】

実験 No	ヒアルロン酸ゲルの溶解率 (%)				備考
	1日後	4日後	7日後	14日後	
1	1	3	4	12	実施例1
2	3	4	6	16	実施例2
3	7	10	25	38	実施例3
4	2	4	5	13	実施例4
5	5	7	12	26	実施例5
6	100 (完全溶解)	1日後の 状態維持	1日後の 状態維持	1日後の 状態維持	比較例2
7	100 (完全溶解)	〃	〃	〃	比較例3
8	100 (完全溶解)	〃	〃	〃	比較例4

#### 【0056】実施例7

##### ヒアルロン酸ゲルの可溶化試験

蒸留水を塩酸でpH1.5に調整した。実施例1で得られたヒアルロン酸ゲルを実施例6記載のリン酸緩衝生理



的食塩水に5日間浸漬した。続いて、このリン酸緩衝生理的食塩水に浸漬して膨潤したヒアルロン酸ゲルを、リン酸緩衝生理的食塩水より取り出した。乾燥重量で15 mgのヒアルロン酸を含むヒアルロン酸ゲルをpH 1.5の水溶液15 mlに浸漬した。この溶液を60℃に設定したオープン中に放置した。1時間後、3時間後、6時間後に0.5 mlずつ溶液をサンプリングした。3時間後に目視で確認できるヒアルロン酸ゲルはほとんど消失していた。

#### 【0057】比較例5

分子量が $2 \times 10^6$  ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを蒸留水に溶解し、0.1重量%のヒアルロン酸の水溶液を調整した。この水溶液のpHを、1 N塩酸でpH 1.5に調整した。このヒアルロン酸の酸性水溶液15 mlを、60℃オープン中に4時間放置し、直鎖状ヒアルロン酸の酸加水分解を行った。

#### 【0058】実施例8

可溶性ヒアルロン酸の分子量と分岐度の測定  
実施例7で可溶化されたヒアルロン酸と比較例5で得られた直鎖状ヒアルロン酸の酸加水分解物は、GPC溶媒で2.5倍に希釈して濃度を0.04重量%に調製し、0.2 μmのメンブランフィルターでろ過した後、0.1 ml注入してGPC-MALLSの測定を行った。GPCカラムとして昭和電工社製SB806HQを1本、示差屈折率検出器として日本分光社製830-RI、M

$$\frac{Kc}{R(\theta)} = \frac{1}{MP(\theta)} + 2A_2c + \dots \quad (1)$$

$$P(\theta)^{-1} = 1 + 1/3 \cdot k^2 \langle S^2 \rangle + \dots$$

$$k = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta/2)$$

【0063】ここで、Mは分子量、 $\langle S^2 \rangle$ は平均2乗慣性半径、Kは光学定数、 $R(\theta)$ は散乱角度 $\theta$ における過剰還元散乱強度、cは高分子濃度、 $P(\theta)$ は粒子散乱関数、 $\lambda$ は溶液中でのレーザー光の波長、 $A_2$ は第2ビリアル係数でありヒアルロン酸では $0.002 \text{ ml} \cdot \text{mol} / \text{g}^2$ である。cは示差屈折率計の出力から、ヒアルロン酸水溶液の屈折率の濃度勾配 ( $dn/dc$ ):

$$g = (M_1/M_2)^{(a+1)/a}$$

【0066】ここで、aはMark-Houwink定数でヒアルロン酸では0.78である。eは素抜け因子で1.0とした。4官能性の長鎖無秩序分岐を仮定して、1本の高分子鎖上の分岐点の数B(分岐度)は以下の(3)式から

ALLSはWyatt社製DAWN DSP-Fを使用して、溶媒硝酸ナトリウムの0.2 M水溶液、測定温度40℃、流速0.3 ml/分、データ取得間隔1回/2秒で測定した。散乱強度の測定は散乱角度 $21.7^\circ \sim 90^\circ$ の8検出器を使った。データ処理ソフトウェアはWyatt社製ASTRA Version 4.10を使用した。

【0059】尚、GPC-MALLS法を用いた可溶性ヒアルロン酸の分子量と分岐度の測定および算出方法について説明する。GPC-MALLS法では、GPCで分離された各フラクションの分子量と慣性半径を連続的に測定することができる。GPC-MALLS法を用いた分岐度の測定は、同一溶出体積のフラクションでの可溶化されたヒアルロン酸の分子量と対照となる直鎖状ヒアルロン酸の分子量を比較して分岐度を計算する溶出体積法によって行った。

【0060】分岐度は可溶化されたヒアルロン酸の高分子鎖1コ当たり存在する分岐点の数であり、可溶化されたヒアルロン酸の分子量に対してプロットされる。

【0061】各フラクションの分子量と慣性半径は、有限濃度におけるジンプロット(1)式を用いて、分子量は散乱角度 $0^\circ$ への外挿値、慣性半径は角度依存の初期勾配から、それぞれ以下の式に従って計算した。

#### 【0062】

##### 【数1】

0.153 ml/g) を使って計算した。

【0064】溶出体積法による各フラクションの分岐度は、以下の(2)式に従って計算した。同一溶出体積のフラクションで、分岐高分子の分子量を $M_b$ 、直鎖高分子の分子量を $M_1$ とすると、収縮因子gが求まる。

#### 【0065】

##### 【数2】

(2)

計算される。

#### 【0067】

##### 【数3】



$$\left[ \left[ 1 + \frac{B}{6} \right]^{0.5} \left[ \frac{4B}{3\pi} \right] \right]^{0.5}$$

【0068】溶出体積法による分岐度の計算方法はGPC-LALLS法による分岐度測定と同じであり、その詳細は、サイズ排除クロマトグラフィー（共立出版 平成3年）に記載されている。

【0069】上記に従い、実施例7で可溶化されたヒア

ルロン酸と比較例5で得られた直鎖状ヒアルロン酸の酸加水分解物の測定を行った。測定結果を表2に示す。

【0070】

【表2】

実験 No.	反応時間 (時間)	重量平均分子量 Mw	分子量分布 Mw/Mn	可溶化率 (%)	備考
9	1	35.7万	1.8	24	実施例7
10	3	57.3万	2.8	85	実施例7
11	6	10.7万	1.8	98	実施例7
12	4	35.0万	1.7	—	比較例5

【0071】例えば、実験No. 9の実施例で反応時間1時間でサンプリングした場合、ヒアルロン酸ゲルの可溶化率が小さい。実験No. 11の反応時間6時間でサンプリングした場合、分子量が大きく低下し分岐度測定が困難になる。実験No. 10の反応時間3時間でサンプリングした場合、ヒアルロン酸ゲルの可溶化率も大きく、分岐点を有するヒアルロン酸の存在を反映して分子量分布も2.8と大きくなっている。

【0072】実験No. 10の実施例7で反応時間3時間でサンプリングした可溶化されたヒアルロン酸と実験No. 12の比較例5で得られた直鎖状ヒアルロン酸の酸加水分解物のGPCクロマトグラムと分岐度の計算結果を図1及び図2に示す。図1から、実施例7のGPCクロマトグラム1は比較例5のGPCクロマトグラム2と比較して、高分子量側にショルダーがあることがわかる。同一溶出体積のフラクションの分子量を比較すると、実施例7では溶出体積8.6ml以下、分子量で約20万以上の領域で比較例5よりも明確に大きな分子量を有することがわかる。実施例7では、分岐点が存在するため、比較例5と比べて、同一溶出体積のフラクションの分子量が大きくなっている。

【0073】図2に比較例5を直鎖状ヒアルロン酸とし

て計算した実施例7の分岐度と分子量の関係を示した。すなわち、分岐度は図1の同一溶出体積のフラクションの両者の分子量から数2と数3を使って計算した。図2から、実施例7の分岐度は分子量約20万以上の領域で、分岐度0.5以上から急速に増大していくことがわかる。本発明で得られたヒアルロン酸ゲル中に、ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でも安定に存在する架橋構造が含まれていることがわかる。

【0074】実施例9

ヒアルロン酸ゲルの膨潤度試験

実施例1で得られたヒアルロン酸ゲルを蒸留水で水洗し、続いて実施例6記載のリン酸緩衝生理的食塩水に浸漬、洗浄し、次いで蒸留水で洗浄した。その後、洗浄したヒアルロン酸ゲルを凍結乾燥した。乾燥重量で100mgのヒアルロン酸ゲルを200mlに浸漬し、室温で24時間放置した。取り出した膨潤したヒアルロン酸ゲルをろ紙上で脱水し、膨潤したヒアルロン酸ゲルの重量を測定した。膨潤倍率は124倍だった。本発明で得られたヒアルロン酸ゲルは、膨潤倍率が測定可能な安定性を有していることがわかった。

【0075】

【発明の効果】以上、本発明によれば、ヒアルロン酸自

体が本来持っている優れた生体適合性の特徴を最大限生かすために、なんら化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することなく、またカチオン性の高分子と複合体化することなく、水中での溶解速度が極めて遅いヒアルロン酸ゲルの製造が可能となる。そして、得られるヒアルロン酸ゲルは、化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用すること起因する生体適合性への悪影響が避けられ、生体内滞留時間が長いので生体適合性材料分野に有用である。

【図面の簡単な説明】

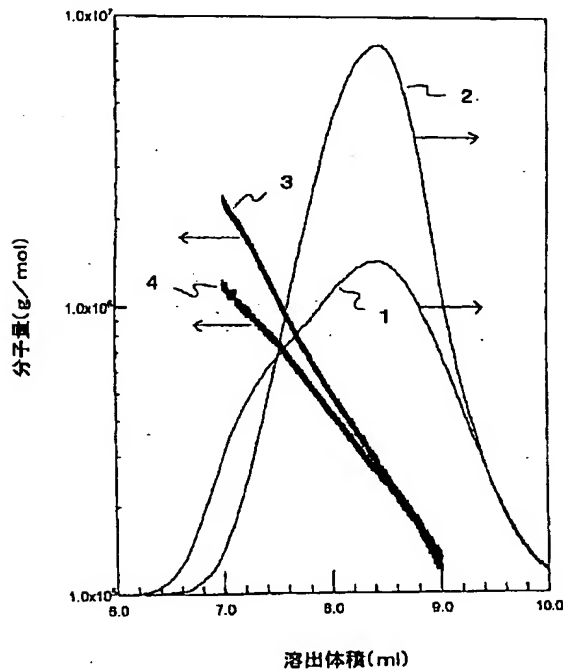
【図1】実施例7と比較例5のGPCクロマトグラムと各フラクションの分子量を対比したグラフである。

【図2】比較例5を直鎖状ヒアルロン酸として計算した実施例7の分岐度と分子量の関係を示すグラフである。

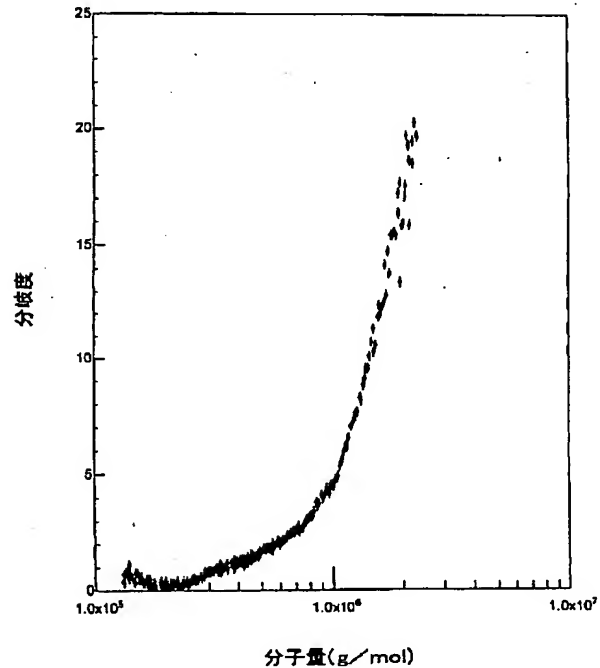
【符号の説明】

- 1 実施例7のGPCクロマトグラム
- 2 比較例5のGPCクロマトグラム
- 3 実施例7の各フラクションの分子量
- 4 比較例5の各フラクションの分子量

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 川田 正寿  
東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化  
学工業株式会社総合研究所内

Fターム(参考) 4C090 AA03 AA07 BA67 BC17 BC27  
BD41 CA19 CA32 DA24